

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
in Marburg
Komm.Direktor: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

VERÄNDERUNGEN IN LIPIDGEHALT UND
ZUSAMMENSETZUNG DER VLDL, LDL UND HDL BEI
HYPERLIPOPROTEINÄMIEN UNTER
CLOFIBRATTHERAPIE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von —

WILLIBALD BUBERL
—
aus Niedersonthofen

Marburg 1977
—

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
in Marburg
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

VERÄNDERUNGEN IN LIPIDGEHALT UND
ZUSAMMENSETZUNG DER VLDL, LDL UND HDL BEI
HYPERLIPOPROTEINÄMIEN UNTER
CLOFIBRAT THERAPIE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

WILLIBALD BUBERL
aus Niedersonthofen

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 27.5.1977

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

Correferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H.-J. Hering

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Methodik	3
2.1. Blutprobengewinnung	3
2.1.1. Patienten	3
2.1.2. Versuchsbedingungen	3
2.1.3. Dosierung	3
2.2. Blutprobenverarbeitung	4
2.2.1. Plasmagewinnung und -lagerung	4
2.2.2. Plasmaverarbeitung	4
2.3. Präparative Ultrazentrifugation	5
2.4. Bestimmung der Phosphatide	12
2.5. Bestimmung der Triglyceride	15
2.6. Bestimmung des Gesamtcholesterins	18
3. Statistik	21
4. Ergebnisse	23
5. Diskussion	34
6. Zusammenfassung	37
7. Anhang	38
8. Literaturverzeichnis	39



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552327_0061

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

An der Bedeutung verschiedener Formen von Hyperlipoproteinämien als Risikofaktor für die Arteriosklerose - und insbesondere die Coronarskleroseentstehung - besteht heute kaum noch Zweifel.

Schwieriger zu beurteilen ist die Wirksamkeit von Senkungen erhöhter Serumlipide durch diätetische und medikamentöse Prävention. Nach einer Phase der unbeirrten Anwendung von diätetischen Maßnahmen und Verordnung von lipidsenkenden Medikamenten ist auf Grund neuerer Ergebnisse aus großen Studien zumindest das Vertrauen in die Wirksamkeit von Lipidsenkern bezüglich der Gefäßprognose erschüttert worden. Hierbei überraschte, daß der zur Zeit am meisten verwandte Lipidsenker auf der Welt, das Clofibrat, nicht in allen Untersuchungen eine günstige Beeinflussung der Gefäßprognose von hyperlipidämischen Patienten bewirkte (8, 9, 30, 35).

Verschiedene Ursachen für die negativen Ergebnisse der größten bisher durchgeführten Untersuchung von lipidsenkenden Medikamenten, des Coronary Drug Projects (8, 58, 59, 60), werden diskutiert: Anwendung auch an nicht-hyperlipidämischen Patienten, mangelhafte Lipidsenkung zur Demonstration einer besseren Gefäßprognose, vorzeitiger Abbruch bei zwei eingesetzten Medikamenten, mangelhafte Dokumentation der eingetretenen Todesfälle in den verschiedenen Therapiegruppen.

Neuere Vorstellungen von Statistikern nennen Teilnehmerzahlen und Beobachtungszeiträume, die zur beweiskräftigen Dokumentation der primär präventiven Wirksamkeit von Serumlipidsenkern erforderlich seien, die bisher noch nie erreicht wurden und aus finanziellen Gründen möglicherweise überhaupt nicht durchgeführt werden können.

Ein anderer Weg zur besseren Erkenntnis der Wirkungsweise und Wirkung ist die detaillierte Untersuchung von Medikamentenwirkungen an kleineren, genauer definierten Patientenkollektiven als dies in Feldstudien mit tausenden von Teilnehmern möglich ist. In diesen Untersuchungen werden im allgemeinen nur die Plasmacholesterin- und -triglyceridwerte bestimmt und ihre Senkung in Relation zum Auftreten von coronaren Herzkrankheiten, Infarkt, Reinfarkt, Tod an Coronarsklerose festgehalten.

Die Lipoproteinforschung hat jedoch in den letzten Jahren gezeigt, daß die verschiedenen Lipoproteinklassen bezüglich spezifischer Dichte (Ultrazentrifugentrennung) oder elektrophoretischer Wanderung (Lipoproteinelektrophoresentrennung) eine unterschiedliche Gefäßaggressivität aufweisen. Es ist damit nötig geworden, den Einfluß von Lipidsenkern nicht auf das Plasmacholesterin und die -triglyceride zu untersuchen, sondern auf die einzelnen Lipoproteinklassen.

Eine derartige Untersuchung, die zu überraschenden Ergebnissen führte, wurde kürzlich bekannt (38): Clofibrat senkte bei 11 Patienten mit Typ IV und 4 Patienten mit Typ IIb zwar die VLDL oder prä- β -Lipoproteine, der Plasmaspiegel an LDL oder β -Lipoproteinen stieg jedoch an. Diese Befundkonstellation ist auf Grund der molekularen Zusammensetzung der verschiedenen Lipoproteine durchaus mit einer Senkung von Gesamtcholesterin und Gesamttriglyceriden im Plasma zu vereinbaren (s. Tabelle 1). Da der Vermehrung der LDL oder β -Lipoproteine eine ausgeprägte Risikofaktorrolle zukommt, könnte diese Beobachtung einen Schlüssel zur Erklärung von Fehlschlägen auf dem Gebiet der medikamentösen Coronarskleroseprävention bieten.

Die Frage nach den Einflüssen von Clofibrat auf die Lipoproteinklassen bei verschiedenen Formen der essentiellen Hyperlipoproteinämien an einer größeren Patientenzahl war deshalb von besonderem Interesse und führte zu der vorliegenden Untersuchung.

2. METHODIK

2.1 Blutprobengewinnung

2.1.1. Patienten

Zur Blutentnahme wurden 80 Patienten der Stoffwechselambulanz der Medizinischen Poliklinik einbestellt, die an den Hyperlipoproteinämien-Typen IIa, IIb, IV und V nach FREDRICKSON erkrankt waren mit Gesamtcholesterinwerten ≥ 300 mg/100 ml und/oder Gesamttriglyceridwerten ≥ 200 mg/100 ml.

Patienten mit ernstesten Leber- und Nierenerkrankungen, sowie nicht vollkompensiertem Diabetes waren ausgeschlossen.

Auch schwangere Personen waren im Patientengut nicht enthalten.

Von 80 Blutprobenserien waren 67 - bei den Phosphatiden 63 - verwertbar, die von 34 männlichen und 33 weiblichen Patienten im Alter von 30 - 79 Jahren (Mittelwert $57,2 \pm 1,9$ Jahre) stammten.

2.1.2. Versuchsbedingungen

Die Patienten wurden von den betreuenden Ärzten über den Sinn und Ablauf des Versuches informiert. Sie erschienen viermal im Abstand von jeweils 4 Wochen nüchtern zur morgendlichen Blutentnahme. Die Blutproben wurden aus der leicht gestauten Armvene entnommen und in heparinisierten Zentrifugenröhrchen aufgefangen.

2.1.3. Dosierung

Die Patienten erhielten jeweils 4 Wochen lang Clofibrat (1,2 g pro die auf 3 Portionen verteilt) und ein Placebo. Es handelte sich hierbei um einen Doppelblindver-

such, bei dem Clofibrat und Placebo zufallsverteilt waren, und die verordnenden Ärzte wie die Patienten nicht wußten, um welche Kapseln es sich jeweils handelte.

2.2 Blutprobenverarbeitung

2.2.1. Plasmagewinnung und -lagerung

Das venös entnommene Blut wurde unverzüglich bei 4000 U/min 15 min lang zentrifugiert und anschließend das Plasma vom Blutkuchen abgetrennt. 6 ml Plasma wurden zur präparativen Ultrazentrifugation (siehe Kapitel 2.3) verwendet und das restliche Plasma auf je 3 Portionen für die Bestimmung der Gesamthosphatide, -triglyceride und des Gesamtcholesterins verteilt. Dieses wurde unverzüglich eingefroren, ebenso wie die nach Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen (VLDL, LDL, HDL).

2.2.2. Plasmaverarbeitung

Der Arbeitsgang wurde in folgender Reihenfolge durchgeführt:

1. Präparative Ultrazentrifugation
2. Phosphatidbestimmung
3. Triglyceridbestimmung
4. Gesamtcholesterinbestimmung

2.3. Präparative Ultrazentrifugation

Zur Trennung des Plasmas in die einzelnen Lipoproteinfraktionen benutzten wir die Methode nach HAVEL, EDER und BRAGDON (21) unter Berücksichtigung eigener Erfahrungen.

Prinzip

Das Plasmalipoproteinspektrum umfaßt einen Dichtebereich von $\varrho = 0,92 - 1,21$ g/ml, im Gegensatz zu den Lipiden, die sich über den Bereich von $\varrho = 0,88 - 0,90$ g/ml erstrecken und den Proteinen, die von $\varrho = 1,30 - 1,35$ g/ml zu finden sind. Bei der präparativen Ultrazentrifugation nehmen die Lipoproteine in dem angegebenen Dichtebereich aber kein kontinuierliches Spektrum ein, sondern bilden gewisse Konzentrationsmaxima und -minima. Durch die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels mit entsprechender Dichte lassen sich die Lipoproteine teils zum Flotieren, teils zum Sedimentieren bringen. Auf diese Weise können die Plasmalipoproteine in prinzipiell 3 Fraktionen getrennt werden, indem das Plasma wiederholt zentrifugiert und dabei die Lösungsmitteldichte durch die Zugabe einer Stammsalzlösung konstanter Dichte fortlaufend erhöht wird. Dazu verwendeten wir eine konzentrierte Salzlösung der Massendichte $\varrho = 1,346$ g/ml.

Die gewünschte Dichte d_G der Mischung errechnet sich wie folgt:

$$A \times d_{VL} + B \times 1,346 = (A + B) \times d_G$$

A = Volumen der vorliegenden Lösung

B = Volumen der erforderlichen konzentrierten
Stammsalzlösung

d_{VL} = Dichte der vorliegenden Lösung

Aus dieser Gleichung ergibt sich für B :

$$B = A \times \frac{d_G - d_{VL}}{1,346 - d_G} \quad (F_1)$$

Durch Zugabe einer berechneten Menge Aqua bidest. zu einem Teil der Stammlösung stellten wir nach F_1 zwei weitere Kochsalzlösungen der Dichten 1,063 g/ml und 1,21 g/ml her. Damit füllten wir entsprechende zu geringe Serummengen isotonisch auf.

Chemikalien

NaCl reinst

KBr reinst

Stammlösung

Zur Herstellung wurden 153,0 g NaCl und 354,0 g KBr mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt. Diese Lösung der Dichte $\rho = 1,346$ g/ml wurde fest verschlossen aufbewahrt, um eine Dichteänderung durch Verdunsten zu verhindern.

Apparatur

Ultrazentrifuge : BECKMANN, Modell L5-50

Rotor: BECKMANN, Typ 40.3

Zentrifugenröhrchen: BECKMANN, Cellulose Nitrate Tubes
No. 302232, Size 1/2" dia x 2 1/2

Verschlußkappen : BECKMANN

Röhrchenschneidevorrichtung: RANDOLPH & RYAN, Nr. 210

Durchführung

Wie BEHRENS (5), modifiziert nach eigenen Erfahrungen, trennten wir die flotierte Oberflächenschicht mit einer Röhrchenschneidevorrichtung von der Bodenfraktion ab. Die Schnittebene lag dabei in einer klaren, farb-

losen, eiweiß- und lipoproteinfreien Zone. Zur Gewinnung der einzelnen Lipoproteinfractionen wurde ein Zentrifugenröhrchen mit 6 ml Plasma gefüllt. Diese Menge reichte auf Grund unserer Vorversuche für die Bestimmungen aus; außerdem war eine genügend breite lipoproteinarmer Zone gegeben, in der ein Abtrennen der Spitzenfraktion ohne Vermischen möglich war.

Vor Beginn eines jeden Laufes wurde die Ultrazentrifuge gemeinsam mit dem Rotor auf + 12°C vortemperiert. Diese Temperatur wurde bis zum Ende eines 22-stündigen Zentrifugenlaufes bei ca. 36000 U/min beibehalten. Diese Umdrehungszahl entspricht einem RCF-Wert⁺ von 105000 g.

$$\begin{aligned}
 + \quad \text{RCF} &= \text{Relative Centrifugal Force} \\
 &= \frac{\text{Zentrifugalkraft}}{\text{Gravitationskraft}} = \frac{\omega^2 \times r}{g} \\
 &= 1,119 \times 10^{-3} \times r \times (\text{rpm})^2 \\
 r &= \text{Radius des Rotors in Meter} \\
 \text{rpm} &= \text{U / min}
 \end{aligned}$$

1. Gewinnung der VLDL-Fraktion

Anfangs pipettierten wir 6 ml Plasma in ein Zentrifugenröhrchen, das fest verschlossen in den Rotor eingeführt wurde. Nach Einsetzen des Rotors in die Ultrazentrifuge lief diese 22 Stunden bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 36000 U/min.

Da das Plasma eine Dichte von 1,006 g/ml besitzt, flotierten innerhalb dieses Zeitraumes alle Lipoproteine der Dichte $\rho \leq 1,006$ g/ml, d.h. die Gruppe der VLDL quantitativ zur Oberfläche, während die Lipoproteine der Dichte $\rho \geq 1,006$ g/ml sedimentierten und sich in der Bodenfraktion anreicherten.

Nach Auslaufen der Ultrazentrifuge wurden die Proben dem Rotor entnommen und mit der Schneidevorrichtung

durchtrennt. Der Abstand der Schnittebene vom Boden der Verschlußkappe wurde der jeweiligen Breite der Flotationsschicht entsprechend gewählt.

Dieses war nach unseren Erfahrungen günstiger als die Methode von BEHRENS (5), weil die VLDL-Schicht je nach Lipoproteingehalt im vorliegenden Plasma in der Breite variierte. Außerdem war ein konstantes Einstellen des Schneidegerätes nicht erforderlich, weil die Spitzenfraktion in ein vorher abgewogenes Einmalreagenzglas pipettiert, anschließend nochmals gewogen und die Menge in g durch Umrechnung in ml nach der Formel

$$V = \frac{m}{\varrho} \quad \text{bestimmt wurde.} \quad (F_2)$$

V = Volumen der Spitzenfraktion in ml

m = Masse in g

ϱ = Massendichte in g/ml

2. Gewinnung der LDL-Fraktion

Nach Abtrennen der Spitzenfraktion wurde der restliche Röhrcheninhalt in ein vorher abgewogenes Zentrifugenröhrchen pipettiert, anschließend gewogen und das Volumen nach F_2 bestimmt. Die präparative Ultrazentrifugation zur Gewinnung der LDL-Fraktion wurde bei einer Lösungsmitteldichte von $\varrho = 1,063$ g/ml durchgeführt. Diese Dichte erreichten wir durch Hinzupipettieren einer bestimmten nach F_1 berechneten Stammlösung ($\varrho = 1,346$ g/ml). Mit isotoner Salzlösung füllten wir das Zentrifugenröhrchen bis zu 6 ml Inhalt auf.

Das weitere Verfahren wurde analog der ersten Fraktionierung vorgenommen.

3. Gewinnung der HDL-Fraktion

Die präparative Ultrazentrifugation zum Abtrennen der HDL-Schicht wurde bei einer Lösungsmitteldichte von $\rho = 1,21 \text{ g/ml}$ durchgeführt.

Das weitere Verfahren wurde analog der ersten Fraktionierung vorgenommen.

Bei den auf die Ultrazentrifugation folgenden Bestimmungen der Fraktionen der VLDL, LDL und HDL war bei der Berechnung zu beachten:

Da in das entsprechende Volumen $Y \text{ ml}$ (je nach Abstand der Schnittebene vom Boden der Verschlußkappe verschieden) die jeweils gewünschten Lipoproteine flotiert waren, die ursprünglich in 6 ml vorlagen, wurden diese auf das $6/Y$ -fache der Ausgangskonzentration angereichert.

Daher mußten wir die Resultate der Cholesterin-, Triglycerid- und Phosphatidbestimmungen korrigieren, indem wir sie durch diesen Wert dividierten.

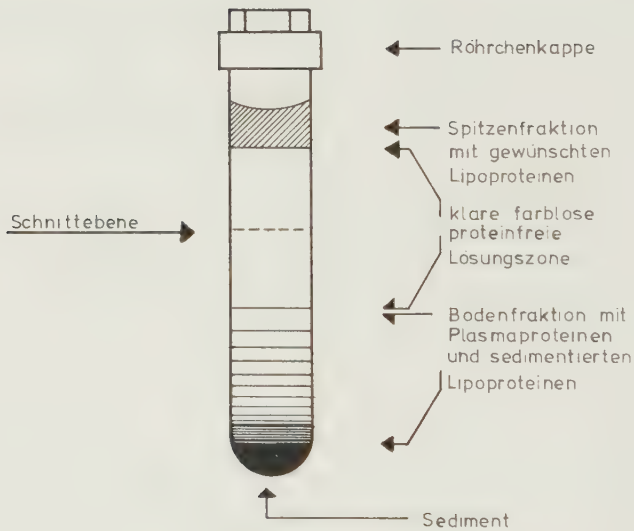


Abb. 1 : Verteilung der Plasmakomponenten in einem Zentrifugenröhrchen nach einem präparativen Ultrazentrifugenlauf.

PLASMA

$d = 1,006 \text{ g/ml}$

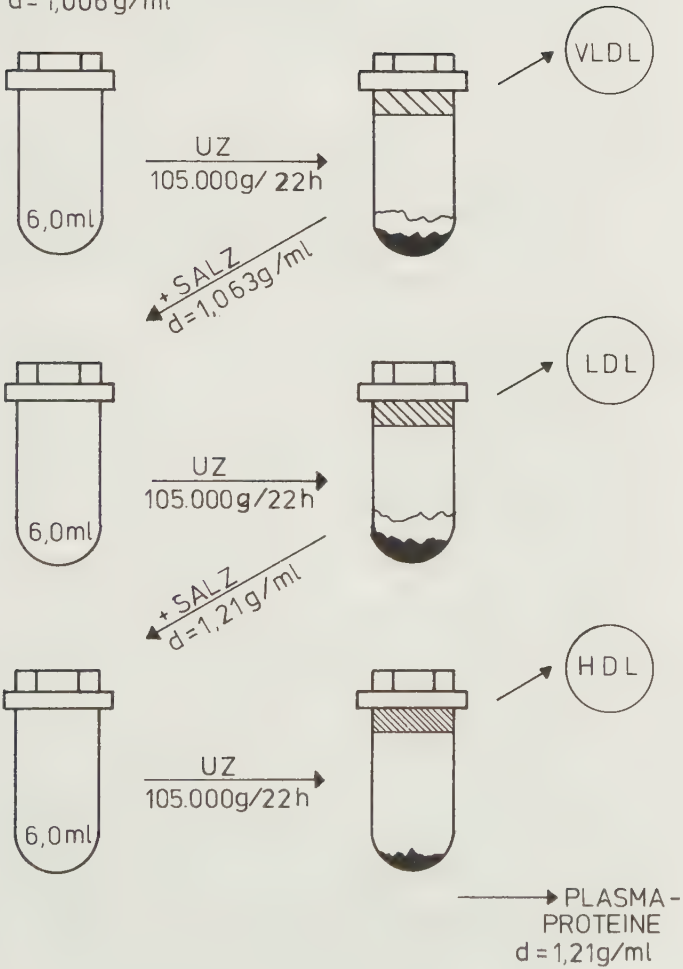


Abb. 2 : Isolierung der Plasmalipoproteinfraktionen mit Hilfe der präparativen Ultrazentrifuge (UZ).

2.4 Bestimmung der Phosphatide

Die Bestimmung der Phosphatide erfolgte über die Phosphoranalyse nach BARTLETT (4); die Veraschung wurde nach ALLEN (3) und die Extraktion der Lipide nach der Methode von FOLCH (15) durchgeführt.

Prinzip

Nach der Bestimmung des Lipidphosphors im FOLCH-Extrakt durch Veraschung und anschließender Entwicklung von Phosphormolybdänblau berechneten wir den Phosphatidgehalt über die Extinktion im ZEISS-Spektralphotometer.

Chemikalien

Chloroform DAB 6

Methanol p.a.

Natriumchlorid p.a.

Perchlorsäure (70%-ig) p.a.

Ammoniummolybdat p.a.

Natriumsulfit p.a.

1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure p.a.

Natriumpyrosulfitsäure p.a.

Kaliumdihydrogenphosphat p.a.

Reagentien

Ammoniummolybdat 0,22%-ig (1,1 g ad 500 ml Aqua bidest.)

Reduktionsreagenz nach FISKE und SUBBA ROW (14):

Zu 200 ml frischangesetzter 13,7%-iger Natriumpyrosulfitlösung wurden 0,5 g 1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure und 2 g wasserfreies Natriumsulfit unter Umrühren gegeben. Die Lösung wurde filtriert, in einer dunklen Flasche aufbewahrt und alle zwei Wochen erneuert.

Anorganischer Phosphorstandard

0,3509 g des vorgetrockneten Kaliumdihydrogenphosphates wurden in einem 1-Liter-Meßkolben gelöst, 10 ml 1.0N Schwefelsäure zugegeben und mit Aqua bidest. auf einen Liter aufgefüllt. Diese Stammlösung enthält in 5 ml 0,4 mg Phosphor und ist unbegrenzt haltbar.

Durchführung

Die Analyse wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Extraktion der Lipide wurden 0,5 ml Plasma und 16 ml Chloroform mit Methanol auf 25 ml aufgefüllt, geschüttelt und filtriert. Zur besseren Trennbarkeit wurden 20 ml des Filtrates in einen Schütteltrichter gegeben und mit 40 ml gesättigter Kochsalzlösung versetzt. Nach kräftigem Schütteln ließen wir die Lösung für 30 min zum Absetzen der Chloroformphase stehen und filtrierten diese anschließend in ein Schliffgläschen.

Anorganisches Phosphat des Plasmas bleibt in der Salz-Wasser-Methanolphase zurück. Der aus den Phosphatiden stammende Phosphor befindet sich in der Chloroformphase.

Anschließend wurden jeweils 0,5 ml des Filtrates bei 70°C für 5 - 10 min eingedampft. Danach wurde in jedes Glas 0,4 ml 70%-iger Perchlorsäure pipettiert, entsprechend auch in eine weiteres Reagenzglas zur Ermittlung des Leerwertes. Die Proben und der Leerwert wurden dann im Sandbad bei 180°C eine Stunde lang verascht. Nach dem Erkalten erfolgte die Zugabe von 4,6 ml einer 0,22%-igen Ammoniummolybdatlösung und von 0,2 ml Reduktionsreagenz. Nach gutem Schütteln wurden die Reagenzgläser für 7 min in ein kochendes Wasserbad gestellt, anschließend abgekühlt und die Extinktionen der Proben gegen den Leerwert im ZEISS-Spektralphotometer bei 830 nm und einer Schichtdicke der Quarzküvetten von 1 cm bestimmt.

In jeder Serie wurde ein Standardwert mitgeführt. Die Standardlösung (2,5 ml) wurde auf 50 ml mit Aqua bi-dest. verdünnt. 0,5 ml dieser Verdünnung gingen als "Tagesphosphorstandard" entsprechend der Probe in den Arbeitsgang ein.

Berechnung

Nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz gilt:

$$\frac{C_P}{C_{St}} = \frac{E_P}{E_{St}} \quad (F_3)$$

C_P = Konzentration der Probe
 C_{St} = Konzentration des Standards
 E_P = Extinktion der Probe
 E_{St} = Extinktion des Standards

Daraus folgt:

$$C_P = \frac{E_P \times C_{St}}{E_{St}} \quad (F_4)$$

Wegen der Verdünnung der Serumproben bei der Extraktion gegenüber dem nicht extrahierten Standard gilt :

$$\text{Phosphor/ml Serum} = \frac{E_P}{E_{St}} \times 4 \times 32 \quad (F_5)$$

in mg/100 ml ausgedrückt :

$$\frac{\text{Phosphor in mg}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \times 4 \times 32 \times 0,1 \quad (F_6)$$

Der Gehalt an Phosphatiden als Lecithin errechnet sich aus dem Phosphorgehalt multipliziert mit 25 :

$$\frac{\text{Phosphatide (als Lecithin) in mg}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \times 25 \times 4 \times 32 \times 0,1$$

(F₇)

Daraus resultiert:

$$C_{Ph} = \frac{E_P}{E_{St}} \times 320 \quad \left[\text{mg} / 100 \text{ ml} \right] \quad (F_8)$$

Kritik

Der Nachweis ist sehr empfindlich. Verunreinigungen durch Spülmittelrückstände oder schlecht destilliertes Wasser verfälschen die Meßwerte.

Fehlerbreite

Bei 10 Parallelbestimmungen ergab sich ein Mittelwert von 247,1 mg/100 ml, die Standardabweichung S_E betrug + 8,13 mg/100 ml, was einer relativen Standardabweichung von 3,29 % entsprach.

5 Bestimmung der Triglyceride

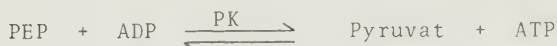
Die Bestimmung der Triglyceride erfolgte nach der Methode von EGGSTEIN und KREUTZ (10, 11), modifiziert nach SCHMIDT und VAN DAHL (43).

Prinzip

Die Triglyceride wurden enzymatisch über ihren Glyceringehalt bestimmt. Dabei wurde das nach der Verseifung der Fette entstandene Glycerin in der durch das Enzym Glycerokinase (GK) katalysierten Reaktion durch Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu Glycerin-1-phosphat phosphoryliert.



Mit Hilfe der Pyruvat-Kinase (PK) wird das entstandene Adenosin-5'-diphosphat (ADP) durch Phosphoenol-pyruvat (PEP) unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP überführt.



Pyruvat wird durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) mittels Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu Lactat hydriert, wobei NADH zu Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD⁺) oxidiert wird.



Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Glycerin-Menge äquivalent. NADH kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 366 nm auf Grund seiner Lichtabsorption gemessen werden.

Für die quantitative Analyse wurde die von der Firma BOEHRINGER entwickelte Biochemica-Test-Combination "Neutralfett und Glycerin" verwendet.

Chemikalien

Äthanolische Kalilauge, ca. 0,5 N

Magnesiumsulfatlösung, ca. 0,15 M

Reagentien

Lösung I : 0,1 M Triäthanolaminpuffer, pH 7,6
4 mM Magnesiumsulfat

Lösung II : 6 mM NADH
33 mM ATP
11 mM PEP

Lösung III: LDH = 800 U/ml
PK = 130 U/ml

Lösung IV : GK = 150 U/ml

Durchführung

In ein Zentrifugenglas wurden jeweils 0,2 ml Plasma und 0,5 ml äthanolische Kalilauge pipettiert und gut durchgemischt. Nach dem Verschuß des Glases mit "Parafilm" wurde in einem 70°C heißen Wasserbad 30 min lang inkubiert und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt. Danach wurde jeweils 1 ml Magnesiumsulfatlösung hinzugegeben, kräftig gemischt und 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert.

In eine Küvette (1cm Schichtdicke) pipettierten wir 0,5 ml des klaren Überstandes und ein Reaktionsgemisch, bestehend aus 2,5 ml Lösung I, 0,1 ml Lösung II und 0,02 ml Lösung III. Nach Durchrühren mit einem Plastikspatel blieb das Gemisch 10 min bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wurde die Extinktion E_1 bei einer Wellenlänge von 366 nm im Photometer nach EPPENDORF gemessen. Danach fügten wir 0,02 ml der Lösung IV dem Küvetteninhalt hinzu, mischten wieder und bestimmten nach 10 min die Extinktion E_2 gegen den Leerwert Luft.

Aus den Extinktionen E_1 und E_2 erhielten wir durch Subtraktion die Extinktionsdifferenz ΔE_{Probe} :

$$\Delta E_p = E_1 - E_2$$

Berechnung der Substratkonzentration

Allgemein gilt die Formel :

$$c = \frac{MG}{\epsilon \cdot d \cdot 10} \times \frac{V}{V} \times F \times \Delta E \quad [\text{mg}/100 \text{ ml}] \quad (F_9)$$

ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH bei 366 nm
 $\hat{=} 3,3 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$

d = Schichtdicke der Küvette $\hat{=} 1 \text{ cm}$

V = Volumen der in die Küvette einpipettierten Lösungsmenge $\hat{=} 1,27 \text{ ml}$

v = Volumen des eingesetzten Überstandes der Verseifungsreaktion $\hat{=} 0,2 \text{ ml}$

F = Verdünnungsfaktor $\hat{=}$ 81,69

$$\Delta E = E_1 - E_2$$

Zu berücksichtigen ist noch der Durchschnittsgehalt des Plasmas an freiem Glycerin mit 1,0 mg/100 ml, was nach den Molekulargewichten (Quotient aus den mittleren Molekulargewichten der Triglyceride - 885 - und des Glycerins - 92,1-) etwa 10 mg/100 ml Neutralfett entspricht.

So ergibt sich für die Konzentration c der Triglyceride im Plasma folgende Bestimmungsgleichung :

$$c = 1432 \times (\Delta E - 10) \quad \left[\text{mg/100 ml} \right] \quad (F_{10})$$

Fehlerbreite

Bei 10 Parallelbestimmungen ergab sich ein Mittelwert von 192,7 mg/100 ml, die Standardabweichung S_E betrug $\pm 3,84/100$ ml, was einer relativen Standardabweichung S_P von 1,99 % entsprach.

2.6. Bestimmung des Gesamtcholesterins

Die Bestimmung des Gesamtcholesterins wurde nach der Methode von WATSON (49), in der Modifikation von RICHTERICH und LAUBER (37) durchgeführt.

Prinzip

Der Nachweis beruht auf der Farbreaktion nach LIEBERMANN und BURCHARDT (6).

Sterine ergeben in wasserfreiem Milieu mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure durch die Bildung polymerer Kohlenwasserstoffe eine blau-grüne Färbung, deren Intensität der Cholesterinkonzentration proportional ist und photometrisch gemessen werden kann.

Statt einer vollständigen Eiweißfällung erfolgt bei der Zugabe von methylierten Benzolsulfonsäuren teils eine Dispersion, teils eine Präzipitation.

Für die quantitative Analyse wurde die von der Firma BOEHRINGER entwickelte Biochemica-Test-Combination "Cholesterin" verwendet.

Chemikalien

Eisessig p.a.

Cholesterin reinst

Essigsäureanhydrid p.a.

Konzentrierte Schwefelsäure p.a.

2,5 - Dimethyl - Benzolsulfonsäure p.a.

Reagentien

Lösung I : 200 mg Cholesterin/100 ml Eisessig

Lösung II : 0,05 mM Dimethylbenzolsulfonsäure

7,0 M Essigsäure

6,5 M Essigsäureanhydrid

Durchführung

Die Analyse wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. In trockene Reagenzgläser wurden 0,1 ml Plasma bzw. 0,1 ml der Lösung I (Cholesterinstandard) bzw. 0,1 ml Aqua bidest. (Leerwert) pipettiert. Dazu gaben wir 2,5 ml der Lösung II, mischten gut durch und stellten die Analysenröhrchen für 5 min in ein Wasserbad von 25°C. Anschließend fügten wir 0,5 ml konzentrierte Schwefelsäure dem Ansatz hinzu, schüttelten kräftig durch und stellten ihn wiederum in das 25°C warme Wasserbad. Danach füllten wir die Lösungen in Küvetten der Schichtdicke 1 cm um und bestimmten bei einer Wellenlänge von 578 nm die Extinktion der Proben und des Standards gegen die des Leerwertes im Photometer nach EPPENDORF.

Berechnung

Nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz gilt aus den Formeln F_3 und F_4 folgendes:

$$\frac{\text{Cholesterin in mg}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \times 200 \quad (F_{11})$$

wobei 200 auf Grund der Konzentration des Cholesterins im Standard als Faktor in die Rechnung eingeht.

Kritik

Bei der hier durchgeführten Methode werden die sonst übliche Extraktion und Enteiweißung umgangen. Dadurch verringert sich die Anzahl der Arbeitsschritte und folglich die Fehlerbreite.

Hämolytische und ikterische Seren verfälschen die Ergebnisse.

Außerdem ist die Wahl der Wellenlänge hierbei problematisch, da wegen der Farbstabilität die Ablesung unter 580 nm erfolgen muß, während das Maximum im Absorptionsspektrum bei über 600 nm liegt.

Fehlerbreite

Bei 10 Parallelbestimmungen ergab sich ein Mittelwert von 271,4 mg/100 ml, die Standardabweichung S_E betrug $\pm 6,59$ mg/100 ml, was einer relativen Standardabweichung S_R von 2,43 % entsprach.

3. STATISTIK

Die Mittelwertberechnung erfolgt nach der Formel:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (F_{12})$$

$$\sum_{i=1}^n x_i \quad = \text{Summe aller Einzelwerte}$$

n = Anzahl der durchgeführten Versuche

Die Standardabweichung, d.h. die Streuung der Einzelwerte wurde bestimmt aus:

$$S_E = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}} \quad (F_{13})$$

Die relative Standardabweichung errechnete sich wie folgt:

$$S_R = \pm \frac{S_E \times 100}{\bar{x}} \% \quad (F_{14})$$

Die Streuung der Mittelwerte ergab sich aus:

$$S_M = \frac{S_E}{\sqrt{n}} \quad (F_{15})$$

Zum Vergleich der Veränderungen vor und nach der Therapie wurde der Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben bei nicht symmetrischer Verteilung angewandt. Damit die beiden Therapiegruppen gegenübergestellt werden konnten, wurde mit dem Wilcoxon-Test für verteilungsfreie Paardifferenzen statistisch ausgewertet (46).

4. ERGEBNISSE

In Tabelle I sind die Wirkungen des Clofibrates auf das Gesamtcholesterin (CH), die Gesamttriglyceride (TG) und die Gesamthospholipide (PL) im Plasma zusammengefaßt.

Es zeigte sich, daß das Gesamtcholesterin nur minimal (Trend, $2p < 0,1$) gesenkt wurde.

Die Triglyceridwerte wurden mit hoher statistischer Signifikanz ($2p < 0,001$) durch Clofibrat erniedrigt. Die Phospholipide wurden nicht signifikant gesenkt.

Tabelle II zeigt die prozentuale Verteilung des Gesamtcholesterins, der -triglyceride und der -phospholipide auf die bei der präparativen Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen (VLDL, LDL und HDL).

Erwartungsgemäß (38) wurde eine Erhöhung der prozentualen LDL-Cholesterinwerte ($2p < 0,001$) beobachtet, die von einer gleichgroßen Senkung des VLDL-Cholesterins begleitet war.

Bei den Triglyceriden zeigte sich in der LDL-Fraktion ebenfalls eine signifikante Erhöhung ($2p < 0,01$), während eine gleichzeitige deutliche Senkung der VLDL-Werte unterblieb.

Bei den Phospholipiden lag ein ähnliches Ergebnis wie beim Cholesterin vor. Auch hier war eine signifikante Erhöhung der LDL-Werte ($2p < 0,001$), bei einer gleichzeitigen signifikanten Erniedrigung der VLDL-Werte ($2p < 0,01$) zu erkennen.

In den HDL-Fractionen wurden jeweils keine signifikanten Veränderungen festgestellt.

Tabelle III zeigt die absoluten Werte des Plasma-Gesamtcholesterins und des Cholesterins in den einzelnen Fraktionen (VLDL, LDL und HDL).

Die Veränderungen waren hierbei nicht signifikant, da die Streuung der Absolutwerte sehr groß war.

Während des gesamten Versuches änderte sich das durchschnittliche Körpergewicht nicht. Die Mittelwerte und die Standardabweichung betrugen nach jeder der vier Phasen 75,3, 75,9, 75,8 und $75,2 \pm 1,4$ kg.

Die Schwankungen des individuellen Körpergewichtes bewegten sich in derselben Größenordnung.

TABELLEN

Tabelle I : Gesamtcholesterin, -triglyceride und -phospholipide im Serum vor und nach den Behandlungsperioden.

Tabelle II : Aufstellung der VLDL-, LDL- und HDL-Fraktionen vor und nach den Behandlungsperioden.

Tabelle III : Absolute Gesamtcholesterinwerte in Gesamtserum, VLDL, LDL und HDL vor und nach den Behandlungsperioden.

Zeichenerklärung:

CH	=	Cholesterin
TG	=	Triglyceride
PL	=	Phospholipide
$\bar{x}$	=	Mittelwert (n = 67)
S_E	=	Standardabweichung (n = 67)
Tr.	=	Trend
n.s.	=	nicht signifikant
+	=	Signifikanz auf 5 % Niveau
++	=	Signifikanz auf 1 % Niveau
+++	=	Signifikanz auf 0,1 % Niveau

Tabelle I : Gesamtcholesterin, -triglyceride und -phospholipide im Serum
vor und nach den Behandlungsperioden

mg/100 ml		Clofibrat (1,2 g/d)			
		vorher	nachher	Diff.	
CH	$\bar{x}$	241,0	226,0	- 15,0	Tr.
	S_E	$\pm 9,4$	$\pm 7,2$	$\pm 8,3$	
TG	$\bar{x}$	414,0	265,0	-149,0	+++
	S_E	$\pm 63,9$	$\pm 24,4$	$\pm 58,8$	
PL ⁺⁾	$\bar{x}$	278,0	258,0	- 20,0	n.s.
	S_E	$\pm 13,0$	$\pm 10,3$	$\pm 11,9$	

+) n = 63

Tabelle II: Aufstellung der VLDL-, LDL- und HDL-Fraktionen vor und nach den Behandlungsperioden

in %		Clofibrat (1,2 g/d)			
		vorher	nachher	Diff.	
CH	VLDL	$\bar{x}$ 29,1 S_E $\pm$ 2,6	19,8 $\pm$ 1,5	- 9,3 $\pm$ 2,0	+++
	LDL	$\bar{x}$ 49,1 S_E $\pm$ 2,2	57,7 $\pm$ 1,7	8,6 $\pm$ 2,0	+++
	HDL	$\bar{x}$ 21,4 S_E $\pm$ 1,1	22,4 $\pm$ 1,1	1,0 $\pm$ 1,3	n.s.
	VLDL	$\bar{x}$ 60,3 S_E $\pm$ 2,0	58,4 $\pm$ 1,7	- 1,9 $\pm$ 1,3	n.s.
	LDL	$\bar{x}$ 19,9 S_E $\pm$ 1,3	22,6 $\pm$ 1,1	2,7 $\pm$ 1,1	++
	HDL	$\bar{x}$ 19,7 S_E $\pm$ 1,2	19,0 $\pm$ 0,9	- 0,7 $\pm$ 0,9	n.s.
PL ^{*)}	VLDL	$\bar{x}$ 27,0 S_E $\pm$ 2,4	20,3 $\pm$ 1,6	- 6,7 $\pm$ 1,9	++
	LDL	$\bar{x}$ 38,1 S_E $\pm$ 2,0	45,3 $\pm$ 1,5	7,2 $\pm$ 1,7	+++
	HDL	$\bar{x}$ 34,9 S_E $\pm$ 1,6	34,4 $\pm$ 1,2	- 0,5 $\pm$ 1,3	n.s.

*) n = 63

Tabelle III: Absolute Gesamtcholesterinwerte im Gesamts Serum, VLDL, LDL und HDL vor und nach den Behandlungsperioden

Clofibrat 1,2 d/d					
mg/100 ml		vorher	nachher	Diff.	
Gesamt	$\bar{x}$ S_E	241,0 + 9,4 + $\underline{\hspace{0.5cm}}$	226,0 + 7,2 + $\underline{\hspace{0.5cm}}$	- 15,0 + 9,3 + $\underline{\hspace{0.5cm}}$	Tr.
VLDL	$\bar{x}$ S_E	69,9 + 8,3 + $\underline{\hspace{0.5cm}}$	43,4 + 3,6 + $\underline{\hspace{0.5cm}}$	- 26,5 + 7,4 + $\underline{\hspace{0.5cm}}$	n.s.
LDL	$\bar{x}$ S_E	119,4 + 8,3 + $\underline{\hspace{0.5cm}}$	132,7 + 6,9 + $\underline{\hspace{0.5cm}}$	13,3 + 6,2 + $\underline{\hspace{0.5cm}}$	n.s.
HDL	$\bar{x}$ S_E	50,3 + 3,3 + $\underline{\hspace{0.5cm}}$	49,4 + 2,6 + $\underline{\hspace{0.5cm}}$	- 0,9 + 3,7 + $\underline{\hspace{0.5cm}}$	n.s.

+) n = 63

Graphische Darstellungen

- I Vergleich der absoluten Cholesterinkonzentrationen der VLDL, LDL, HDL und ihrer Standardabweichungen vor und nach der Therapie mit Clofibrat bei den Fredrickson-Typen IIa, IIb, IV und V (n = 67).
Darstellung 1
- II Prozentuale Differenzen und Standardabweichungen der Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidwerte in VLDL, LDL und HDL vor und nach der Therapie mit Clofibrat, aufgeteilt auf die verschiedenen Hyperlipoproteinämietypen.

Darstellung 2 : Fredrickson-Typen IIa, IIb, IV, V
(n = 67)

Darstellung 3 : Fredrickson-Typ II (n = 19)

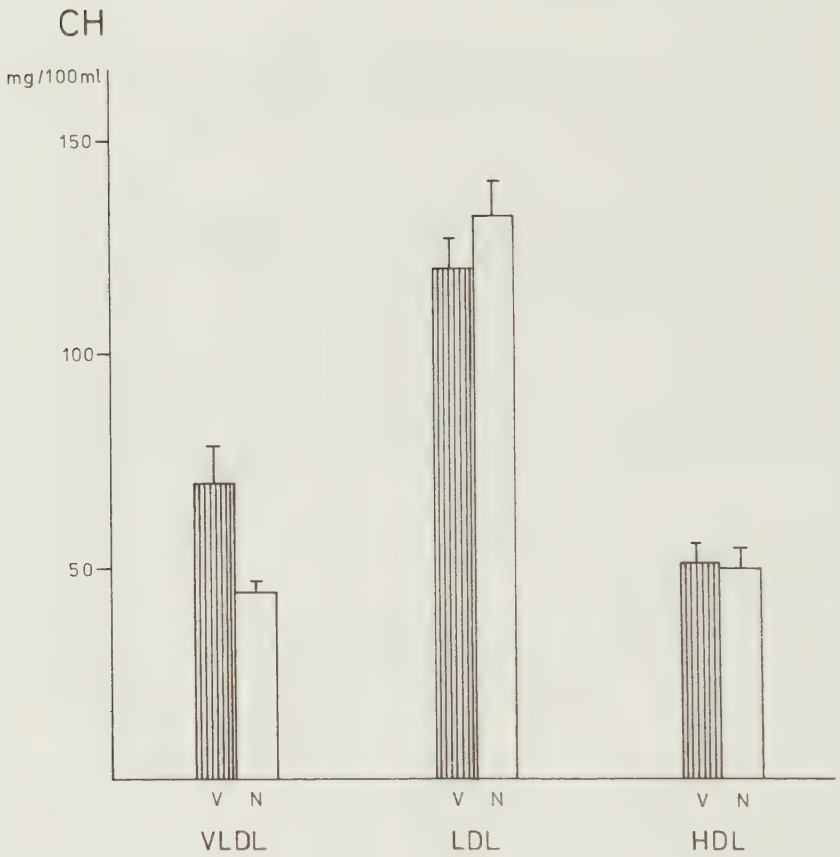
Darstellung 4 : Fredrickson-Typ IV (n = 37)

Zeichenerklärung:

T = Standardabweichung

V = vor Therapie

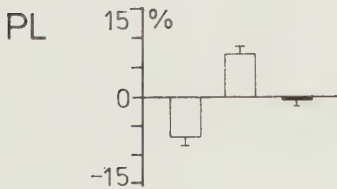
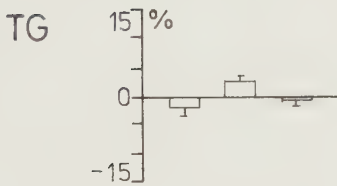
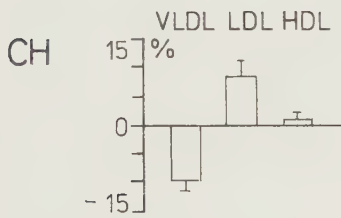
N = nach Therapie



Darstellung 1

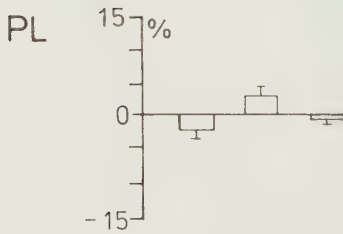
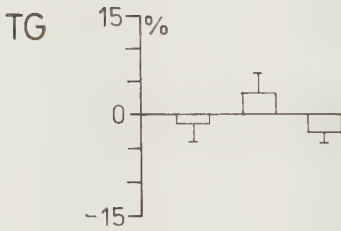
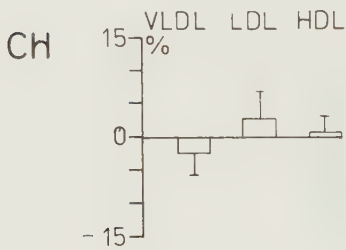
Fredrickson - Typ IIa,IIb,IV,V (n=67)

Clofibrat
1.2 g/d



Fredrickson - Typ II (n=19)

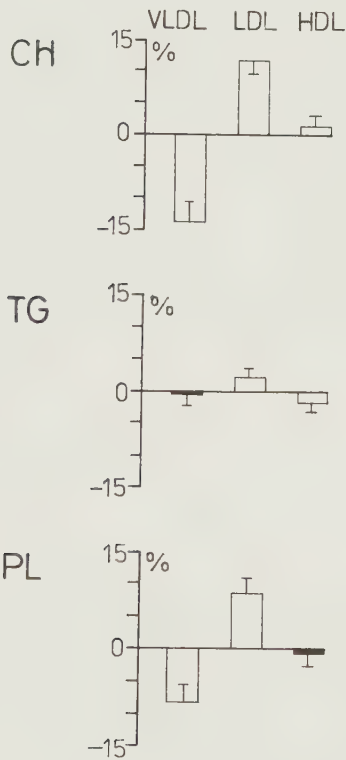
Clofibrat
1.2 g/d



Darstellung 3

Fredrickson - Typ IV(n=37)

Clofibrat
1.2g/d



Darstellung 4

5. DISKUSSION

Die Wirkungen von Clofibrat auf die Bildung von VLDL können einmal zu einer Erniedrigung der Gesamtzahl an produzierten VLDL, zum anderen zu einer veränderten Zusammensetzung oder zu beidem gleichzeitig führen.

Ob eine isolierte Verminderung der Produktion von normal zusammengesetzten VLDL vorliegt, läßt sich unter Berücksichtigung der Lipoproteinkonzentrationen (s. Anhang 1) aus folgenden Ergebnissen entscheiden:

Die Triglyceridfraktion der VLDL, die 60 % der Gesamttriglyceride des Plasmas ausmacht, fällt unter Clofibrattherapie um 1,9 % (nicht signifikant) ab; die Cholesterinfraktion, die nur 29,1 % des Gesamtcholesterins vor der Behandlung darstellt, sinkt dagegen um 9,3 % (hochsignifikant) ab. Das bedeutet, daß die durch Ultrazentrifugation isolierbaren VLDL unter Clofibratwirkung mehr an Cholesterin als an Triglyceriden verarmt sind. Umgekehrt ist der Anteil an Cholesterin und Triglyceriden, der in den LDL vorliegt, angestiegen, und zwar Cholesterin um 8,6 %, Triglyceride um 2,7 %.

Das kann seine Erklärung nur teilweise in der nicht proportionalen Senkung des Gesamtcholesterins von 241 auf 226 mg/100 ml finden. Wenn dieser Abfall nur in den VLDL stattgefunden hätte, müßte der Anteil der LDL an den Gesamttriglyceriden viel deutlicher als beobachtet zunehmen, und vor allem mehr als der Cholesteringehalt.

Aus diesen Daten läßt sich nur folgern, daß Clofibrat bei den untersuchten Patienten mit Hyperlipoproteinämien keine einfache Verminderung normal zusammenge-

setzter VLDL hervorgerufen hat. Vielmehr ist die relative Abnahme der Triglyceride in den VLDL unterproportional, der Cholesterinanstieg in der LDL-Dichteklasse überproportional.

In Anbetracht der Senkung der Gesamttriglyceride von 414 auf 265, also um 149 mg/100 ml, das sind 36 %, können die geringeren Differenzen nur bedeuten, daß alle Lipoproteine an Triglyceriden verarmt sind, die VLDL und HDL geringfügig mehr, die LDL weniger.

Der Cholesterinanteil ist bei einem Abfall des Gesamtwertes um ca. 7 % (15 von 241) bei den VLDL um 9,3 % gefallen, bei den LDL (hochsignifikant) und HDL (nicht signifikant) angestiegen. Es hat damit eine vergleichsweise generelle Triglyceridsenkung bei ausgeprägter Verlagerung von Cholesterin aus den VLDL in die LDL stattgefunden. Diese Veränderungen lassen sich anhand einer neuen Arbeitshypothese des Lipoproteinkatabolismus und der Hyperlipoproteinämieentstehung (7) deuten:

DICHTE	< 1,006		1,006 - 1,063	
	VLDL → IMP → LDL ₁ → LDL ₂			
LIPIDGEHALT	TG - REICH	CH - REICH	TG - REICH	CH - REICH

Abbildung 5 : Umwandlung der VLDL im Blut über VLDL-Zwischenprodukte (IMP) und LDL₁ in LDL₂ und Lipidgehalt der jeweiligen Fraktionen.

Eine Senkung der Produktion von Triglyceriden in der Leber mit triglyceridärmeren VLDL führt auch in den nachfolgenden Lipoproteinen zu einer Triglyceriderniedrigung. Die jetzt gebildeten triglyceridärmeren Lipoproteine stellen weniger gute Substrate für die am Katabolismus beteiligten Enzyme dar und führen zu einem längeren Verbleib von LDL₁ und LDL₂ in der Blutbahn. Daraus resultiert eine relative LDL-Vermehrung.

Da die Veränderungen in den HDL keine Signifikanzen zeigten, wird auf die Bedeutung der HDL als ausgleichender Faktor gegenüber der Atherogenität der LDL lediglich hingewiesen.

Ein möglicherweise wichtiger Faktor für die Abbaufähigkeit von triglyceridreichen Lipoproteinen ist ihr Fettsäuremuster (s. Anhang 2).

Es wäre denkbar, daß unter Clofibrattherapie relativ mehr gesättigte Fettsäuren in die VLDL inkorporiert werden und dadurch eine längere Halbwertszeit induziert wird.

6. ZUSAMMENFASSUNG

80 hyperlipidämische Patienten der Medizinischen Poliklinik - 67 Blutprobenserien waren verwertbar, bei den Phospholipiden nur 63 - erhielten jeweils 4 Wochen lang Clofibrat (1,2 g/d) und ein Placebo.

Nach jeder Blutentnahme wurde das Plasma in der Ultrazentrifuge in die einzelnen Lipoproteinfraktionen VLDL, LDL und HDL getrennt. In diesen Unterfraktionen sowie im Gesamtserum wurden jeweils Phospholipide, Triglyceride und Cholesterin bestimmt.

Es zeigte sich, daß das Gesamtcholesterin nur minimal, die Gesamtpospholipide nicht und die Gesamttriglyceride hochsignifikant gesenkt wurden.

In den durch Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen beobachteten wir eine Erhöhung des Cholesterins in den LDL bei gleichgroßer Senkung in den V LDL. Das Ergebnis bei den Phospholipiden sah ähnlich aus.

Bei den Triglyceriden trat in der LDL-Fraktion ebenfalls ein signifikanter Anstieg auf, während eine Senkung der LDL-Werte, wie sie bei Kombinationstherapie mit EPL + Clofibrat gefunden wurde (33), unterblieb.

In den HDL-Fractionen wurden jeweils keine signifikanten Veränderungen festgestellt.

Es wurde versucht, die Wirkungsweise des Clofibrates zu erklären: Möglicherweise führt dieses Medikament zu einer Verlängerung der Halbwertszeit, indem es eine Umverteilung im Fettsäuremuster induziert.

Daraus ergäbe sich, daß eine weitere bisher nicht öffentlich diskutierte Ursache für die enttäuschenden Ergebnisse von Clofibrat auf die Langzeitgefäßprognose gefunden wäre und Clofibrat alleine zur Behandlung und Prophylaxe coronarer Herzerkrankungen weniger geeignet erscheint.

7. ANHANG

1. Mittlere Plasma-Lipoproteinwerte von Stoffwechsel-
gesunden in mg/100 ml (48)

(Nach: FREDRICKSON, 1972)

n	Alter	VLDL	LDL	HDL
143	0-19	12 $\pm$ 8	103 $\pm$ 27	52 $\pm$ 13
88	20-29	16 $\pm$ 10	112 $\pm$ 29	52 $\pm$ 12
67	30-39	17 $\pm$ 9	126 $\pm$ 33	51 $\pm$ 15
59	40-49	19 $\pm$ 11	134 $\pm$ 30	58 $\pm$ 16
24	50-59	25 $\pm$ 11	161 $\pm$ 30	45 $\pm$ 11

2. Fettsäuremuster (%der gesamten Fettsäuren)
der Lipoproteinklassen einer Einzelperson (48)

(Nach GOODMAN-SHIRTORI, 1964)

Fettsäure	VLDL	LDL	HDL
Triglyceride			
Ölsäure	28,8	25,0	24,2
Palmitinsäure	2,8	3,4	4,1
Linolsäure	44,6	44,4	40,4
Stearinsäure	14,1	14,3	13,6
Cholesterinester			
Linolsäure	48,2	52,1	52,5
Ölsäure	26,9	23,9	23,6
Palmitinsäure	13,6	12,0	11,6
Stearinsäure	1,5	1,1	1,3

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. AHRENS, E.H. The Management of Hyperlipidemia
Whether, Rather than How
Ann. Int. Med. 85, 87-93 (1976)
2. AHRENS, E.H. Carbohydrate-induced and fat-in-
HIRSCH, J. duced lipemia
OETTE, K. Trans. Ass. Amer. Phyc. 74,
FARQUAHR, J.W. 134 (1961)
STEIN, Y.
3. ALLEN, R.J.L. The estimation of phosphorus
Biochem. J. 34, 858 (1940)
4. BARTLETT, G.R. Phosphorus assay in column mato-
graphy
J. Biol. Chem. 234, 466 (1959)
5. BEHRENS, U. Über die Haltbarkeit von Plasma-
lipoproteinen bei Raumtemperatur
oder im Kühlschrank
Inaug.-Diss., Marburg 1976
6. BURCHARDT, H. Beiträge zur Kenntnis der Chole-
sterine
Inaug.-Diss., Rostock 1889
7. CARLSON, L.A. Lipid Composition of the Major
Human Serum Lipoprotein Density
Classes in Different Types of
Hyperlipoproteinemia
In Lipoprotein Metabolism
Ed.: H. Greten, Springer-Verlag
Berlin-Heidelberg-New York,
69-79 (1976)
8. CARLSON, L.A. Results of the Coronary Drug Pro-
RÖSNER, S. ject - an Interpretation
Atherosclerosis, 22, 317-324
(1975)

9. DEWAR, H.A. Trial of clofibrate in the treatment of ischaemic heart disease (five-year study by a group of physicians of the Newcastle upon Tyne region)
Br. Med. J. 4, 767-775 (1971)
10. EGGSTEIN, M. Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe, KREUTZ, F.H. I. Mitteilung: Prinzip, Durchführung und Besprechung der Methode
Klin. Wschr. 44, 262 (1966)
11. EGGSTEIN, M. Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Serum und Gewebe, KREUTZ, F.H. II. Mitteilung: Zuverlässigkeit der Methode, andere Neutralfettbestimmungen, Normalwerte für Triglyceride im menschlichen Blut
Klin. Wschr. 44, 267 (1966)
12. EISENBERG, S. On the metabolic conversion of human plasma very low density lipoprotein to low density lipoprotein, BILHEIMER, D.W. LEVY, R.I. LINDGREN, F.T.
Biochim. Biophys. Acta, 326, 361-377 (1973)
13. FEINSTEIN, A.R. The clofibrate trials: another dispute about contratrophic therapy
Clin. Pharmacol. Ther. 13, 953-968 (1972)
14. FISKE, C.M. The colorimetric determination of phosphorus, SUBBA ROW, Y.
J. Biol. Chem. 66, 375 (1925)
15. FOLCH, J. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, LEES, M. SLOANE-STANLEY, D.H.
J. Biol. Chem. 226, 497 (1957)
16. FREDRICKSON, D.S. A system for phenotyping hyperlipoproteinemia
Circulation 31, 321 (1965)

17. FREDRICKSON, D.S. Fat transport in lipoproteins
LEVY, R.I. - an integrated approach to
LEES, R.S. mechanisms and disorders
New Engl. J. Med. 276, 34, 94,
148, 215, 273 (1967)
18. GOLDSTEIN, J.L. Hyperlipidemia in coronary heart
SCHROTT, H.G. disease
HAZZARD, W.R. J. Clin. Invest. 52, 1533-1577
BIERMAN, E.L. (1973)
MOTULSKY, A.G.
19. GOTTFRIED, S.P. Serum beta- lipoproteins of normal,
POPE, R.H. atherosclerotic, and lipemic in-
FRIEDMAN, N.H. dividuals
AKERSON, I.B. Clin. Chem. 1, 253 (1955)
DI MAURO, S.
20. GUSTAFSON, A. Studies of the composition of
ALAUPOVIC, P. serum lipoproteins - Isolation,
FURMAN, R.H. purification and characterization
of very - low - density lipopro-
teins of human serum
Biochem. 4, 596-603 (1965)
21. HAVEL, R.J. Composition of ultracentrifugally
EDER, H.A. separated lipoproteins in human
BRAGDON, J.H. serum
J. Clin. Invest. 34, 1345-1358
(1955)
22. HEADY, J.A. A cooperative trial on the pri-
mary prevention of ischaemic
heart disease using clofibrate:
design, methods, and progress
Bull WHO 48, 243-256 (1973)
23. HOEFLMAYR, J. Erkennung von Fettstoffwechsel-
FRIED, R. störungen, I. Mitteilung:
Gesamtlipide im Serum
Med. Klin. 62, 1323 (1967)
24. HOEFLMAYR, J. Einige Probleme der Hyperchole-
sterinämie
Ärztl. Praxis 26, 1604 (1963)

25. HUNNINGHAKE, D.B. Long-term effects of clofibrate
TUCKER, D.R. (Atromid-S) on serum lipids in
AZAMOFF, D.L. man
Circulation 39, 675-683 (1969)
26. JAHNKE, K. Die Bluteiweißkörper in der Ultra-
SCHOLTAN, W. zentrifuge, Sedimentation -
Flotation
G. Thieme Verlag - Stuttgart
S. 120 (1960)
27. JEPSON, E.M. Treatment of essential hyperlipi-
TORRENS, P.E. demia
FAHMY, M.F.I. Lancet 2, 1315-1319 (1969)
BILLIMORIA, J.D.
28. KAFFARNIK, H. Vermehrungen der Blutfette, ihre
Ursache und ihre Therapie
Deutsches Ärzteblatt - Ärztliche
Mitteilungen 17, 1289-1294,
18, 1363-1369 (1970)
29. KANNEL, W.B. Serum cholesterol, lipoproteins,
CASTELLI, W.P. and the risk of coronary heart
GORDON, T. disease
MC NAMARA, P.M. Ann. Int. Med. 74, 1-12 (1971)
30. KRASNO, L.R. Clofibrate in coronary heart
KIDERA, G.J. disease
JAMA 219, 845-851 (1972)
31. LEVY, R.I. The efficacy of clofibrate (CPIB)
QUARFORDT, S.H. in familial hyperlipoproteinemia
BROWN, W.V. W.L. Holmes, L.A. Carlson and
R. Paoletti (Eds.), Drugs Affec-
ting Lipid Metabolism (Proceedings
of the 3rd International Symposium
on Drugs Affecting Lipid Metabo-
lism, Milan, Italy Sept. 1968)
Plenum Publishing Co., New York,
N.Y. 377, (1969)
32. MIETTINEN, T.A. Change of lipoprotein pattern by
PENTILLA, I.M. clofibrate in hyperglyceridemia
LAMPAINEN, E. and mixed hyperlipidemia
Acta Med. Scand. 192, 177-182
(1972)

33. MÜLLER-METZLER, R. Einfluß oral applizierter Phospholipide auf die durch Clofibrattherapie induzierten Veränderungen in Lipidgehalt und Zusammensetzung der Plasmalipoproteine bei hyperlipidämischen Patienten
Inaug.-Diss., Marburg, in Vorbereitung
34. NICHOLS, A.V.
STRISOWER, E.H.
LINDGREN, F.T.
ADAMSON, G.L.
GOGGIOLA, E.L. Analysis of change in ultracentrifugal lipoprotein profiles following heparin and ethyl-p-chlorophenoxyisobutyrate administration
Clin. Chim. Acta, 20, 277-283 (1968)
35. OLIVER, M.F. Ischaemic heart disease: a secondary prevention trial using clofibrate (report by a research committee of the Scottish Society of Physicians)
Br. Med. J. 4, 775-784 (1971)
36. RAUTERBERG, W. Über die Häufigkeit der Koronarsklerose und des Myocardinfarktes in der Nachkriegszeit
Dtsch. Gesundheitswesen 12 (1958)
37. RICHTERICH, R.
LAUBER, K. Bestimmung des Gesamtcholesterins im Serum, VIII. Mitteilung über Ultramikromethoden im klinischen Laboratorium
Klin. Wschr. 40, 1252 (1962)
38. ROSE, H.G.
HAFT, G.K.
JULIANO, J. Clofibrate-induced low density lipoprotein elevation: Therapeutic implications and treatment by colestipol resin
Atherosclerosis, 23, 413-427 (1976)

39. ROSE, H.G. Inheritance of combined hyperlipo-
KRAHZ, P. proteinemia - Evidence for a new
WEINSTOCK, M. lipoprotein phenotype
JULIANO, J. Amer. J. Med. 54, 148-160 (1973)
HAFT, J.I.

40. SACKS, L. Statistische Auswertungsmethoden
Springer Verlag Berlin-Göttingen
-Heidelberg 1969

41. SCHETTLER, G. Arteriosklerose
G. Thieme Verlag Stuttgart
306 (1961)

42. SCHETTLER, G. Neuere Ergebnisse klinischer Fett-
stoffwechselstudien
Medizin und Ernährung 6, 201 ff.
(1965)

43. SCHMIDT, F.H. Zur Methode der enzymatischen Neu-
VAN DAHL, K. tralfettbestimmung in biologischem
Material
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
6, 156 (1968)

44. SCHNEIDER, J. Unveröffentlichte Ergebnisse

45. SEGAL, P. Effect of clofibrate on lipopro-
ROHEIM, P.S. tein metabolism in hyperlipid-
EDER, H.A. emic rats.
J. Clin. Invest. 51, 1632-1637
(1972)

46. STEGIE, R. Der Paardifferenzen-W-Test zur
Wirkungsbeurteilung klinischer
Behandlungen in paarigen Stich-
proben
Drug Res. 26, 1708 (1976)

47. STRISOWER, E.H. Treatment of hyperlipidemias
ADAMSON, G. Amer. J. Med. 45, 488-501 (1968)
STRISOWER, B.

48. UNDEUTSCH, D. Fettstoffwechselstörungen
Physiologie und Pathophysiologie,
Untersuchungsmethoden, Epidemio-
logie und Klinik
Schattauer Verlag, 85 (1975)

49. WATSON, D. A simple method for the determination of serum cholesterol
Clin. Chim. Acta 5, 637 (1960)
50. WEBER, E. Grundriß der biologischen Statistik
G. Fischer Verlag 1964
51. WILSON, D.E. Metabolic relationship among the
LEES, R.S. plasma lipoproteins
J. Clin. Invest. 51, 1051 (1972)
52. WINKELMAN, J. Phenotyping of hyperlipoproteinemias,
WYBENGA, D.R. effect on electrophoretic pattern of
IBBOTT, F.A. serum storage at ambient, refrigeration, or freezing temperatures
Clin. Chem. 16, 507 (1970)
53. YESHURUNI, D. Drug Treatment of Hyperlipidemia
GOTTO, A.M. Amer. J. Med. 60, 379-396 (1976)
54. ZELIS, R. Type IV hyperlipoproteinemia-Clofibrate
AMSTERDAM, A. without dietary therapie
SPANN, J.F. J. Amer. Med. Ass. 222, 326-328
MASON, D.T. (1972)
55. ZÖLLNER, N. Störung des Lipidstoffwechsels:
Prinzipien der Therapie
Klin. Wschr. 45, 112 (1976)
56. Classification of hyperlipidemias and hypolipoproteinemia
Bull. Wld. Hlth. Org. 43, 891-908 (1970)
57. Lipid-lowering drugs
Med. Lett. Drugs Ther. 17, 49-50 (1975)
58. The Coronary Drug Project Research Group, Clofibrate and niacin in Coronary heart disease
J. Amer. Med. Ass. 231, 360-381 (1975)
59. The Coronary Drug Project. Initial findings leading to modification of its research protocol
J. Amer. Med. Ass. 214, 1303 (1970)
60. The Coronary Drug Project Research Group. The Coronary Drug Project. Design, methods and baseline results
Circulation 47, Suppl. 3 (1973)

Herrn Prof. Dr. Klaus danke ich für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Kaffarnik für die Überlassung des Themas aussprechen.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Dr. J. Schneider für seine hilfreichen Hinweise zur Durchführung dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Hausmann, Herrn und Frau Drs. Mühlfellner und Herrn Dr. Schubotz für ihre Hilfe bei der Blutentnahme, sowie Herrn Diplom-Mathematiker Zöfel vom Rechenzentrum der Universität Marburg für die statistische Auswertung der Ergebnisse.

Danken möchte ich zuletzt auch Frl. E. Metzler für das Anfertigen der technischen Zeichnungen.

LEBENS LAUF

Am 25. Oktober 1951 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Willibald Buberl und seiner Ehefrau Johanna, geb. Dittrich, in Niedersonthofen/Allgäu geboren.

Nach unserem Umzug nach Herbertshofen und dem weiteren Übersiedeln nach Biessenhofen wurde ich dort 1958 eingeschult. 1962 wechselte ich an das Staatliche Gymnasium Kaufbeuren (altsprachlicher Zweig) über, wo ich am 19.6.1971 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1971/72 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Physik und Chemie. Zum Sommersemester 1972 wechselte ich nach Marburg über und nahm dort an der Philipps-Universität das Studium der Zahnheilkunde auf.

Im September 1972 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab, die zahnärztliche Vorprüfung bestand ich im März 1974.

Am 19. November 1976 beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen.

Marburg, den

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

In München

Autrum, Becker, Boehm, Faessler, Huisgen, Jacobs.

In Marburg

Ahrens, Amon, Baltzer, Bernhardt, Bode, Castenholz, Dimroth, Haberich, Hennis, Hensel, Hering, Heuser, Janke, Karlson, Kleinsasser, Koransky, Lauer, Maroske, Petry, Pfütz, Portig, Richter, Rohen, Rupec, Schienbein, Schiff, Schmidt, Schmitz-Mohrmann, Schnell, Schulte-Herrmann, Seidel, Walcher.

